

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-198771

(43)Date of publication of application : 29.08.1991

(51)Int.Cl.

C12N 5/02

C12N 5/06

(21)Application number : 01-340061

(71)Applicant : SANYO ELECTRIC CO LTD

(22)Date of filing : 27.12.1989

(72)Inventor : YAMADA ATSUSHI
IZEKI MASAHIRO

(54) PATTERNING METHOD FOR NEUROCYTE

(57)Abstract:

PURPOSE: To ensure neurocytes to be patternedly grown simply and in high accuracy by forming an electrolytically polymerized polymer film with a specified pattern on a substrate and by putting this film under the culture conditions for neurocytes.

CONSTITUTION: A substrate [for example, a metallic plate such as of platinum, an electrically conductive material such as carbon plate, or a material on which an electrically conductive film has been formed in a specified pattern (rectangularly, comb-shaped pattern, striped pattern, etc.) on the surface of an electrical insulator like a glass] is immersed in an electrolyte containing a monomer for electrolytic polymerization such as aniline, a protein such as immobilizable nerve growth factor(NGF) and a neurocyte growth promoter capable of doping such as amino acid (e.g. glutamic acid). Thence, the system is put to electrolysis in this state to proceed with a polymerization, thus forming an electrolytically polymerized polymer film on an electrode. Subsequently, neurocytes such as of the cerebellum of a vertebrate are incubated on the resulting patterned film according to the established processes. Thereby, the objective patterning of the neurocytes can be performed simply and in high accuracy and the growth of the cells will also be good.

⑯ 日本国特許庁(JP)

⑰ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-198771

⑤ Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成3年(1991)8月29日

C 12 N 5/02
5/06

7236-4B

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 神経細胞のパターン化方法

⑰ 特 願 平1-340061

⑱ 出 願 平1(1989)12月27日

⑯ 発 明 者 山 田 淳 大阪府守口市京阪本通2丁目18番地 三洋電機株式会社内
⑰ 発 明 者 井 関 正 博 大阪府守口市京阪本通2丁目18番地 三洋電機株式会社内
⑱ 出 願 人 三 洋 電 機 株 式 有 限 公 司 大阪府守口市京阪本通2丁目18番地
⑲ 代 理 人 弁 理 士 野 河 信 太 郎

明 細 書

1. 発明の名称

神経細胞のパターン化方法

2. 特許請求の範囲

(1) 基体上に、神経細胞成長促進物質を固定化又はドーピングしてなる所定パターンの電解重合高分子膜を形成し、この電解重合高分子膜形成基体を神経細胞の培養条件に付すことにより、上記電解重合高分子膜上にパターン状に神経細胞を成長させることを特徴とする神経細胞のパターン化方法。

3. 発明の詳細な説明

(イ) 産業上の利用分野

本発明は、神経細胞をパターン状に成長させる方法に関し、所定パターンの神経細胞成長層を簡便に形成することができる方法を提供するものである。

(ロ) 従来の技術

近年、神経細胞に人工的なネットワークを作らせ、その系の挙動や素子としての神経細胞の機能

を測定する方法が注目を浴びている。これは一方でバイオコンピュータへの指針となり、一方では生理学的な研究に貢献する方法である。つまり人工の素子ではなく複雑な機能を備えた神経細胞をそのまま用いてこれらを自由にネットワーク化できれば、脳のように高度な情報処理を行うバイオコンピュータにつながる可能性がある。また生理学の分野でも、特定の神経細胞間のシナプス結合や神経伝達物質の研究には、人工的神経構築が欠かせない。神経細胞は固体の表面上でしか成長できないので、固体の表面状態を変化させて細胞が接着又は附着しやすいパターンを作り、その上で神経細胞を培養する方法が一般に用いられている。従来の神経細胞パターン化方法には、具体的に以下のような方法がある。

(1) 正電荷をもつ基質上にパターン化する方法

神経細胞の細胞膜表面は負電荷で被われているため、正電荷をもつ基質には親和性を強くもつ一方、負電荷をもつ基質には付着しない。この性質を利用して、負電荷もしくは電荷をもたない基板

上に正電荷をもつ基質をパターン状に塗布もしくは結合させ、その上で細胞を培養する方法である。正電荷をもつ基質として、ポリリシン、ポリアルギニン、ポリオルニチン、アミノアルキルシラン (D.Kleinfeld et.al, Journal of Neuroscience, November 1988, 8(11): 4098-4120) などが用いられている。

(2)疎水性物質上から神経細胞を排除してパターン化する方法

疎水性物質でネガパターンを作り、そこから細胞を排除することによって、逆にパターンを作り出す方法である。疎水性物質としてアルキルシラン (D.Kleinfeld et.al, Journal of Neuroscience, 8, 4098-4120(1988).) などが用いられている。

(3)細胞が生体内で接着している基質上にパターン化する方法

神経細胞は生体中では基質となるようなタンパク質に付着した形態で生存している。また細胞が移動する際や神経突起を伸ばす際には、これらのタンパク質を手がかりにすると考えられている。

-3-

すると、神経突起は溝によって方向づけられて成長することが報告されている [福田潤 et.al, 「神経細胞による微小立体構造と表面分子構造の認識」、日本生理学会第 66 回大会予稿集 301(1989)]。

(6)神経細胞もしくは神経突起の成長を促す物質によるパターン化方法

神経細胞の成長を促す物質として有名なものに神経成長因子 (NGF) がある。生体内で NGF を分泌する細胞があると、神経細胞はその方向に神経突起を伸ばす。この性質を利用して神経突起の成長方向を制御しパターン化する方法である。この場合は成長促進物質をピペット等で局所的に与える必要がある。

(7)電氣的制御によるパターン化方法

神経細胞の細胞内電位をガラス電極によって変化させると神経突起の成長が制御できることが、カタツムリの神経細胞で報告されている (D.P.Mc Cobb et.al, Developmental Biology, 130, 599-609(1989).)。

-5-

これらのタンパク質のパターンを作製し、この上で神経細胞を培養することにより、生体内と同じように機能させて神経細胞のパターンを作製する。ここで用いるタンパク質として、コラーゲン [福田潤 et.al, 「コラーゲン線維による神経線維成長の方向づけ」、生物物理学会第 26 回年会講演予稿集, S 233(1988)]、ラミニン (R.Timpl et.al, Journal of Biological Chemistry, 254, 9933-9937(1979).)、フィブロネクチン等が用いられている。

(4)金属酸化物上にパターン化する方法

インジウムやアルミニウム等の金属の酸化物をミクロンオーダーのパターン状に塗布した培養用基板を用いることにより、培養神経細胞の神経突起成長方向を制御することが報告されている [鳥光慶一 et.al, 「神経突起成長方向制御」、生物物理学会第 27 回年会予稿集 S 155(1989)]。

(5)基板に刻んだ微小な溝構造によるパターン化方法

微小な溝構造を刻んだ基板上で神経細胞に培養

-4-

(ハ)発明が解決しようとする課題

しかしながら、これらの従来のパターン化方法においては、いずれにおいても正確なパターンを得るのが困難であったり、形成される神経細胞層の成長形態も不良であることが多いという問題点があった。ことに、パターン化方法(1)~(3)のうち基質等の物質を塗布する必要のあるものについてはパターンの空間分解能を高めることが難しく、パターン化方法(5)については溝の加工に高い精度が必要であり、パターン化方法(6)、(7)については 2 次元平面上で局所的な部分しか制御できない等の欠点があった。

本発明は、かかる状況下なされたものであり、従来困難であった簡単に精度の高いパターン化方法を提供しようとするものである。

(ニ)課題を解決するための手段

本発明者らは、上記観点から鋭意研究を行った結果、パターン化した電極を電解重合に付し、その際、電解系に神経細胞成長を促進させる物質を存在させて得られた電解重合高分子膜をパターン

-6-

化基体として用いることにより、上記目的を達成しうることを見だし、この発明を完成するに至った。

かくしてこの発明によれば、基体上に、神経細胞成長促進物質を固定化又はドーピングしてなる所定パターンの電解重合高分子膜を形成し、この電解重合高分子膜形成基体を神経細胞の培養条件に付すことにより、上記電解重合高分子膜上にパターン状に神経細胞を成長させることからなる神経細胞のパターン化方法が提供される。

この発明における基体としては、電解重合における電極として作用しうる導電材又は導電膜形成材を用いることができ、この導電材は導電膜を所定形状にパターン化しておくことにより、正確にパターン化された電解重合高分子膜を形成することが可能となる。具体的な基体としては、白金、金、アルミニウム等の金属板、カーボン板等の所定形状の導電材や、白金、金、アルミニウム、カーボン等の導電膜をガラス、プラスチック等の絶縁体表面に所定パターン（矩形状、くし状、スト

ライブ状等）に形成してなる導電膜形成材が挙げられる。なお、絶縁体上への導電膜のパターン形成は、蒸着法、CVD法等により、あるいはこれらの気相成長技術とメッキ法とを組み合わせることにより行うことができる。

このような基体を、電解重合用モノマーと神経細胞成長促進物質を含有する電解質中に浸漬し、この状態で電解を行って重合を進行させることにより、神経細胞成長促進物質を固定化又はドーピングしてなる電解重合高分子膜を上記電極面上に簡便かつ効率的に形成することができる。ここで電解重合高分子膜は少なくともミクロンオーダーの空間分解能で電極上に形成される。したがってミクロンレベルのパターン化にも対応できる点もこの発明の1つの利点である。

上記電解重合用モノマーとしては、水溶性でかつ水溶液中で重合しうるものが適しており、例えば、アニリン、ピロール、*o*-フェニレンジアミン、フェノール等が挙げられる。溶液中のモノマー濃度はとくに限定されないが、通常0.1~0.2M

-7-

程度が適している。

この発明において用いられる神経細胞成長促進物質には、上記電解重合の際に電解重合高分子膜の成長中に非イオンの捕捉されて固定化されるものと、イオンの高分子膜中にドーブされるものに分けられる。通常、分子量が約500以上のものは電解重合高分子膜に固定化することが可能である。また分子量が約150以下で中性溶液中でアニオンになっているものは通常ドーピングすることが可能であり、神経の培養時にその放出を電位によって制御することが可能である。

上記固定化が可能な神経細胞成長促進物質としては神経成長因子（NGF）、ソマトスタチン、FMRFアミド、スモール・カルディオアクティブ・ペプチドA（SCP_A）、スモール・カルディオアクティブ・ペプチドB（SCP_B）、バソアクティブ・インテスティナル・ポリペプチド（VIP）、プロクトリン、グリア由来ネクシン（GDN）等のペプチドもしくはタンパク質が挙げられる。また、ドーピングが可能である神経細胞成

-9-

長促進物質としては、グルタミン酸、アスパラギン酸、 γ -アミノ酪酸、グリシン等のアミノ酸類が挙げられる。これらの成長促進物質は、培養する神経細胞の種類に対応して適宜選択される。これらの電解質溶液中への添加量は特に限定されないが、固定化する物質については $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ドーピングする物質については 10^{-4}M 程度が適当である。

一方、電解重合用の支持電解質としては、電解重合に用いられる一般的な塩が使用でき、 p-ト ルエンスルホン酸アルカリ金属塩、 AsF_6 アルカリ金属塩、 ClO_4 アルカリ金属塩、 BF_4 アルカリ金属塩等が適しているが、ドーブしようとする物質についてはそのアルカリ金属塩を直接使うこともできる。これらの支持電解質濃度としては、0.05~0.1M程度が適している。この際の電解重合は、室温等の緩和な温度下で行うのが適しており、神経細胞を構成するペプチドもしくはタンパク質の活性をできるだけ低下させないように0℃付近で行うのが好ましい。また電解条件は、

-8-

定電位法、定電流法、電位走査法のいずれを用いてもよい。例えば定電位電解で重合を行う場合には、電解電位 $0.6 \sim 0.8 \text{ V} \quad \text{vs. Ag/AgCl}$ とするのが適している。電解重合時間により、形成される高分子膜の厚みを調整することができる。かかる厚みは、神経細胞の成長の支持体として十分な厚みであればよい。場合によっては、ドーブされたイオン成分を電氣的に放出(脱ドーブ)しう程度の厚みに調整されてもよい。

神経細胞の培養は、公知の方法に従い上記のパターン化した電解重合高分子膜上で行われる。ここで培養神経細胞は、脊椎動物の小脳、海馬、脊髓、上動神経節、後根神経節網膜等及び無脊椎動物の各種神経節から解離して用いる。解離の方法としてトリプシン処理や、ビベッティングなどの操作を行う。培養時の神経細胞の密度は実験の目的に合わせて適宜決定すればよい。培養液の組成や血清の有無および培養温度、pHなども培養する神経細胞の種類や性質によって決定する。

(ホ) 作用

-11-

電極板 2 (幅 5 mm 、 2×2 格子) をプラスチック培養皿内に固定し導線を取り付けた。この培養皿内に 0.1 M ビロール及び神経成長因子 NGF ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$)、を含む電解液水溶液 (0.1 M バラトルエンスルホン酸ナトリウム、 0.1 M リン酸緩衝溶液、 $\text{pH} 7.0$) を注入し、 0°C 約 5 分間の定電位電解酸化重合 ($0.7 \text{ V} \quad \text{vs. Ag/AgCl}$) を行い、白金電極板上にポリビロール-NGF 固定化(包括)高分子膜(約 $2 \mu\text{m}$ [電気量より換算])を形成した。

このポリビロール-NGF 固定化高分子膜電極を備えた培養皿を十分水洗いした後、ここにモルモット上動神経筋からトリプシン処理によって解離した神経細胞をプレーティングした (8×10^4 細胞/ cm^2)。プレーティングの約 90 分後に液を子牛血清 10% 含む Gibco 社製の DMEM/F12 倍溶液に交換し、接着しなかった細胞を取り除いた。培養は 37°C 、二酸化炭素濃度 5%、湿度 100% のインキュベータ内で行った。

第 1 図に培養 1 日後の培養皿側面図を示す。図

-13-

電解重合系にモノマーと共存するペプチドやタンパク質等からなる神経細胞成長促進物質は、モノマーのパターン化電極面上への重合に伴って重合膜中に包括固定されることとなる。また、電解重合系にモノマーと共存する低分子アニオン等からなる神経細胞成長促進物質は、モノマーのパターン化電極面上への重合時にドーパントとして取り込まれることとなる。

そしてこのような成長促進物質含有の電解重合高分子膜上で神経細胞を培養すれば、神経細胞が固定化又はドーピングされた成長促進物質に沿って成長もしくは神経突起を伸ばし、電解重合高分子膜のパターン通りにネットワークが形成される。またドーピングされた成長促進物質を局所的に任意の時期に放出させることにより、時系列に沿った形でのパターン制御も可能になる。

(ヘ) 実施例

以下、この発明の一実施例を図面と共にさらに詳細に説明する。

まず、第 2 図に示すようにパターン化した白金

-12-

中、1 はプラスチック培養皿、2 はパターン化した白金電極、3 はポリビロール-NGF 固定化高分子膜、4 はモルモット上動神経節細胞成長層、5 は培養液を各々示すものである。このように神経細胞はポリビロール-NGF 固定化高分子膜上に接着し、活発に神経突起を伸ばすが、プラスチック培養皿の上ではほとんど接着せず、接着したとしても神経突起を伸ばすような成長は行わなかった。このようにポリビロール-NGF 固定化高分子膜上に選択的に神経の成長を制御することができた。

また同様なポリビロール-NGF 固定化高分子膜を備えた培養皿を繰り返し作製して培養を行ったところ、再現性および神経細胞の活性も良好であり、電解重合法により NGF の固定化が再現性良く行えることも判明した。

一方、NGF を固定化しないポリビロール膜を作製し培養を行ったところ、膜への細胞の接着および成長が一部みられたが、その程度は NGF を固定化したものに比べ劣っていた。したがって神

-14-

神経細胞の成長が促進するのは固定化したNGFに起因し、ポリピロールはそれをサポートするにすぎないことも判明した。

(ト) 発明の効果

この発明による神経細胞のパターン化方法によれば、従来の方法に比して、簡便かつ高精度に神経細胞のパターン化を行うことができ、細胞の成長も良好である。また電解重合高分子膜自体が導電性を持っているため、電気的制御によりドーパントの局所的放出や神経細胞の活動をモニターすることも可能となる。さらに電解重合高分子を用いた電気化学的な手法によって神経細胞成長促進物質が固定化又はドーピングされているので、エネルギー的にコストが安く、膜厚制御も容易である。

4. 図面の簡単な説明

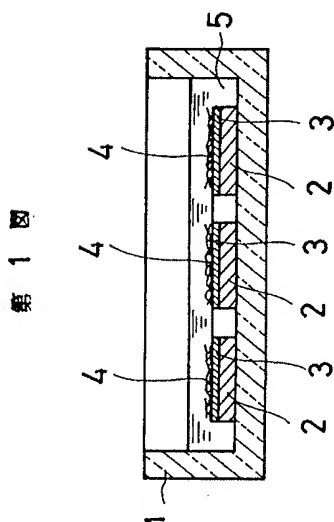
第1図はこの発明によってパターン化された培養神経細胞の形態を示す説明図、第2図はパターン化に用いた白金電極の形状を示す上面図である。

- 1 ……プラスチック培養皿、
- 2 ……白金電極板、
- 3 ……ポリピロール-NGF固定化高分子膜、
- 4 ……モルモット上動神経節細胞成長層、
- 5 ……培養液。

代理人 弁理士 野 河 信太



-15-



-16-

